

姜花属 SRAP 分子标记连锁图谱构建

高丽霞¹，刘 念²，黄邦海³

(1 河池学院化学与生命科学系，广西 宜州 546300；2 仲恺农业工程学院，广东 广州 510225；
3 广州市农业技术推广中心，广东 广州 510520)

摘要：采用拟测交作图策略，利用白姜花×圆瓣姜花的 F₁ 群体 87 个单株，分别构建了父母本的基于 SRAP 标记的连锁图谱。通过筛选，414 对引物中，92 对引物可以检测到拟测交位点。在检测到的 398 个拟测交位点中，237 个来自于父本圆瓣姜花，161 个来自于母本。经过卡方（²）测验及连锁分析，父本中，203 个标记进入 23 个连锁群，覆盖了 1 386.8 cm；母本中，139 个标记进入 18 个连锁群，覆盖了 917.1 cm。
关键词：F₁ 群体；连锁图谱；拟测交作图
中图分类号：Q 943 文献标识码：A 文章编号：0253 - 2700 (2009) 04 - 317 - 09

Linkage Maps of the Genus *Hedychium* (Zingiberaceae) Based on SRAP

GAO Li-Xia¹，LIU Nian^{2**}，HUANG Bang-Hai³

(1 Department of Chemistry and Life Science, Hechi University, Yizhou 546300, China; 2 Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China; 3 Guangzhou Municipal Center for the Promotion of Agricultural Technologies, Guangzhou 510520, China)

Abstract: In this study, using a pseudo-cross strategy, we constructed two maps of *Hedychium*, *Hedychium coronarium* and *Hedychium forrestii* based on SRAP markers. The mapping population consisted of 87 progenies, from a F₁ population. A total of 414 primer pairs were screened and 92 pairs were considered. Among 398 loci, 237 loci were from the paternal parent and 161 were from the maternal parent. After ² test and linkage analysis, two maps were constructed as following: The paternal parent contained 203 loci and spanned 1 386.8 cm, which spread over 23 linkage groups. The maternal parent contained 139 loci and spanned 917.1 cm. These loci were distributed in 18 linkage groups.
Key words: F₁ population; Linkage map; Pseudo-cross strategy

姜花属（*Hedychium*）隶属于姜科姜亚科姜花族（吴德邻，1981），其植株形态优美，花序多姿多彩，是姜科植物中最具观赏特性的类群之一。该属的育种目标主要有香气、花色、花序、瓶插期及株型等方面，由于缺乏对一些控制重要农艺性状的基因的研究，培育优良性状的工作受到了严重阻碍。分子标记连锁图谱是根据标记在后代中的分离来确定标记的连锁情况，较高密度的分子标记图谱能有效地应用于数量性状基因定

位、图位基因克隆、比较基因组学研究以及分子标记辅助育种中。在育种工作中，高密度的遗传连锁图可有效地找出与重要农艺性状连锁的标记，从而可以作为辅助育种的分子标记。
前人在姜花属分子标记方面所做的工作甚少，更谈不上连锁图谱构建。究其原因可能是姜花属的天然杂合性致使没有纯系可以用来进行亲本配制，另一方面，姜花属的自交不亲和性使得获得纯系变得不可能，故姜花属的遗传连锁图谱

基金项目：广西高校重点建设实验室建设资助项目（桂西北特色资源研究与开发）
通讯作者：Author for correspondence; E-mail: liunian678@163.com
收稿日期：2009- 02- 26，2009- 04- 09 接受发表
作者简介：高丽霞（1980-）女，博士，研究方向：园林植物与观赏园艺。

构建不可能像近交物种那样利用 F₂、BC₁、DH 等群体来进行。基于姜花属的这种研究现状，姜花属的遗传连锁图的构建可以采取双向拟测交作图。

拟测交作图策略是 Grattapaglia and Seder (1994) 首先在校树的遗传图谱构建中提出的，他们利用 RAPD 标记分别对双亲进行作图，双亲图谱分别覆盖了 1 552 cm 和 1 101 cm。此法适用于天然杂合性高、主要采用无性繁殖的植物，一般采用 F₁ 群体进行遗传连锁图谱构建和 QTL 作图。同年，Bradshaw 等 (1994) 对一个杨属的杂交群体也进行了图谱构建。所谓“拟测交”即对那些一个亲本中杂合而在另一个亲本中为哑等位的位点和在双亲中均呈杂合性的位点进行检测，这些位点在后代中呈 1 1 或 3 1 的比例分离，然后确定这些位点的亲本来源，分为两组（父本和母本），利用作图软件选取回交群体的模式对双亲分别进行图谱构建和 QTL 定位。利用 F₁ 群体构建连锁图谱逐渐成为林木上构建遗传图谱的重要、甚至是唯一的手段。此作图方法不止适用于林木植物的图谱构建，对于天然杂合性高、主要采取无性繁殖的植物均可用此方法，国外很多学者运用此法也完成了很多之前难以完成的植物的图谱构建。Lanteri 等 (2006) 利用 4 种分子标记分别建立了朝鲜蓟的一个杂交组合亲本的连锁图谱，此外草地早熟禾 (Porceddy 等, 2002)，黑麦草 (Jones 等, 2002)，野生六出花 (Arcade 等, 2000)，猕猴桃 (Testolin 等, 2001) 等植物均用此法构建了遗传连锁图。

相关序列扩增多态性 (Sequence-Related Amplified Polymorphism, SRAP) 标记是由美国加州大学蔬菜作物系 Li and Quiros (2001) 提出。该标记多态性高、重复性好、操作简单、没有物种特异性，现已广泛应用于图谱构建 (林忠旭等, 2003)、比较基因组学 (Li 等, 2003) 和遗传多样性分析 (Ferriol 等, 2003)。本文利用该标记采用拟测交作图策略进行遗传连锁图谱构建，为进行重要农艺性状的 QTL 定位，以实现分子标记辅助育种打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

作图群体是包含 87 个单株的 F₁ 群体，其母本白姜花 (*Hedychium coronarium* J. K nig) 是广州传统的香型切花，又称为“蝴蝶花”，父本圆瓣姜花 (*Hedychium forrestii* Diels.) 是抗性较强的野生种。种子收获后立即播种于恒温 28 温室中的潮湿花盆土中。10~20 天后出芽，两个月后选取茁壮的幼苗移栽大田。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取和 SRAP 分析的方法 具体方法及所用引物参考高丽霞等 (2008)。

1.2.2 SRAP 引物筛选 利用双亲及 6 个 F₁ 个体筛选在双亲中呈现多态而子代中有分离的较强扩增谱带的引物。由于选择的位点符合 1 1 或 3 1 分离，根据公式 $1 - (1 - 1/2^n)^n$ (n 为子代个体的数目，为拟测交位点的中选概率)，则拟测交位点的中选概率为 98.4% 和 99.8%。利用选中的引物对包括双亲在内的共 89 个单株的 DNA 样品进行扩增反应，获得 SRAP 标记。标记在后代中的分离方式如图 1 所示。

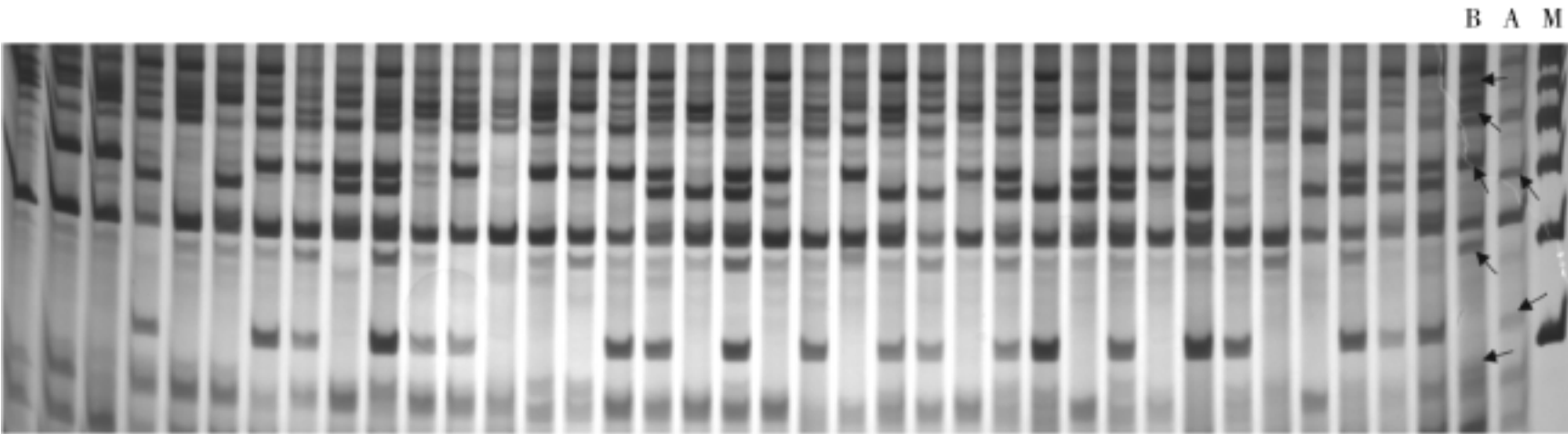


图 1 引物 F17R20 在 37 个杂交后代及亲本中的扩增结果
箭头所指为拟测交位点，M，A，B 本别表示 DNA Marker，白姜花，圆瓣姜花
Fig .1 SRAP patterns of 37 F₁ plants and parents, *Hedychium coronarium* (A) and *Hedychium forrestii* (B), amplified with primer combination F17 R20 . Segregating SRAP markers are indicated by arrows . DNA markers (M) with a decreasing molecular weight—800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp

1.2.3 图谱构建方法 银染所得凝胶经凝胶成像系统拍摄后，分析两次，结果稳定的标记用来进行图谱构建。标记在后代群体中可能有 3 种分离方式：（1）来自于母本的拟测交位点，即仅存在于母本白姜花中，并在后代中分离（预期分离比 1 1）；（2）来自于父本的拟测交位点，即仅存在于父本圆瓣姜花中，并在后代中分离（预期分离比 1 1）；（3）来自于双亲的拟测交位点，即父母本中共同存在，且均为杂合状态（预期分离比 3 1）。用卡方（ χ^2 ）测验来检验分离位点是否为孟德尔分离。符合孟德尔分离（ $\chi^2 = 0.1$ ）或稍有偏离（ $0.05 < \chi^2 = 0.1 < \chi^2 = 0.05$ ； $0.05 < \chi^2 = 0.05 < \chi^2 = 0.01$ ）的标记用来进行图谱构建。连锁分析用 Mapmaker3.0（Lander 等，1987）采用回交群体的模式来完成，LOD 3.0，遗传距离的单位用 Kosambi 法。包含 4 个标记以上的连锁群（LG）视为有效连锁群，连锁群作图根据连锁分析结果用 Mapdraw2.1 软件完成。位点是根据其引物组合加上按分子量从高到低的序号来命名的。稍偏离孟德尔分离的位点依据其偏离水平分别用“*”（ $0.1 < \chi^2 = 0.05$ ）和“**”（ $0.05 < \chi^2 = 0.01$ ）表示（图 2，3）。

2 结果

2.1 SRAP 引物

在 132 对呈现多态性的引物中，均可检测到拟测交位点，我们选取 92 对结果清晰稳定的引物所得到的多态性片段来进行图谱构建。92 对引物共检测到 411 条多态性片段，包括 398 条 1 1 分离片段和 13 条 3 1 分离片段。每对引物能检测到的位点数从 2 到 7 不等，平均为 4.1 条对。在 398 个拟测交位点中，237 个来自于父本圆瓣姜花，161 个来自于母本白姜花。经过卡方测验，49 个

位点偏离孟德尔分离（ $\chi^2 > \chi^2_{0.1}$ ），其中 20 个来自于母本，29 个来自于父本。11 个严重偏离的位点（ $\chi^2 > \chi^2_{0.01}$ ）及少数的 3 1 位点（不能建立父母本间的连接）没有用于图谱构建。多态性片段的分子量大都分布在 80 bp 到 1 000 bp 之间，多集中于 200~500 bp。标记的具体分布情况见表 1。

2.2 图谱构建

在卡方测验后所剩的 387 个位点中，342 个最终进入了 4 个标记以上的连锁群。在母本白姜花的连锁图谱中，139 个标记形成了 18 个连锁群，一个三联体。15 个标记没有进入连锁群，共覆盖了 917.1 cm。单个连锁群的长度从 21.9 cm 到 96 cm 不等，平均为 51.0 cm，包含位点为 4~15 个。各标记的间距从 0 到 34.6 cm 不等，平均为 7.6 cm，另有一些标记呈现共分离，间距为 0。在此连锁图中，共有 21 个标记呈现共分离，涉及 5 个位点，有 14 个零间距。除去这些零间距，标记的平均间距为 8.6 cm。11 个稍偏离位点被连锁在三个连锁群上，其中 0.05 水平上 5 个，0.01 水平上 6 个。这些偏离标记在两个连锁群上（LGH，LGI）形成聚焦。在三个连锁群上（LGH，LGH，LGI）出现了标记聚焦现象。

父本圆瓣姜花的连锁图谱上 203 个标记进入了 23 个连锁群，共覆盖 1 386.8 cm，连锁群数多于其染色体基数，另外，还有 3 个三联体和 5 个二联体，10 个标记没有进入任何连锁群。23 个连锁群包含的标记数从 5 到 17 不等，平均 8.8 个；长度范围为 31.4~159.9 cm，平均为 60.3 cm。

表 1 父母本中用于作图的标记分离情况
Table 1 Markers generated for the genetic mapping in the paternal and the maternal parents

	筛选引物 No . of primers screened	选用引物 No . of primers used	父本 Paternal	母本 Maternal	总计 Total
标记 Markers	414	92	237	161	398
偏离标记 $\chi^2_{0.1} < \chi^2 = 0.05$ Distorted markers $\chi^2_{0.1} < \chi^2 = 0.05$ (%)			18 (7.6%)	7 (4.3%)	25 (4.3%)
偏离标记 $\chi^2_{0.05} < \chi^2 = 0.01$ Distorted markers $\chi^2_{0.05} < \chi^2 = 0.01$ (%)			6 (2.5%)	9 (5.6%)	15 (3.4%)
偏离标记 $\chi^2 > \chi^2_{0.01}$ Distorted markers $\chi^2 > \chi^2_{0.01}$ (%)			5 (2.1%)	4 (2.5%)	9 (2.3%)
偏离标记总数 Total distorted markers (%)			29 (12.2%)	20 (12.4%)	49 (12.3%)
作图标记总数 Total mapped markers (%)			222 (93.6%)	142 (88.2%)	364 (91.5%)
未连锁标记数 Unlinked markers			10	15	25

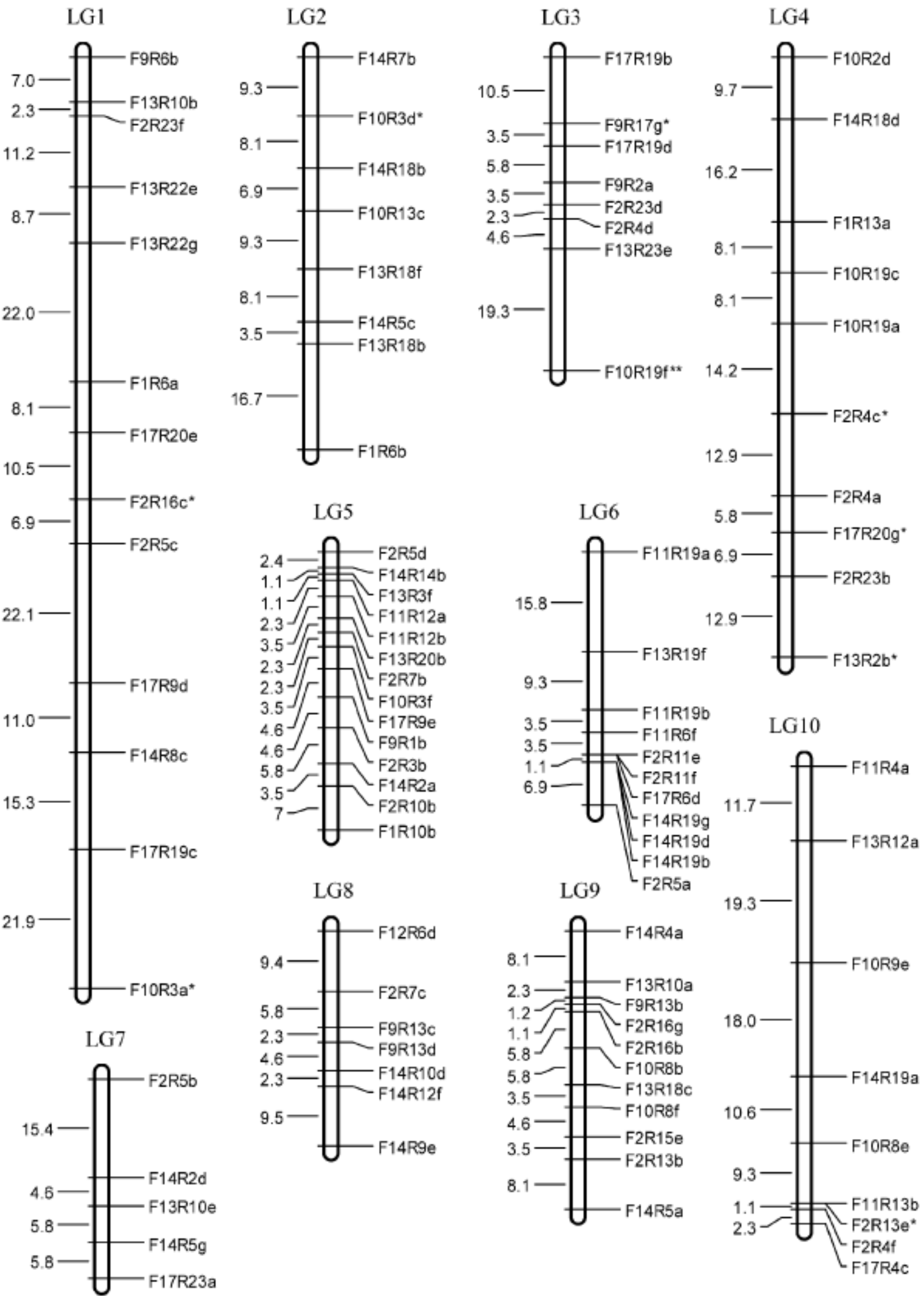
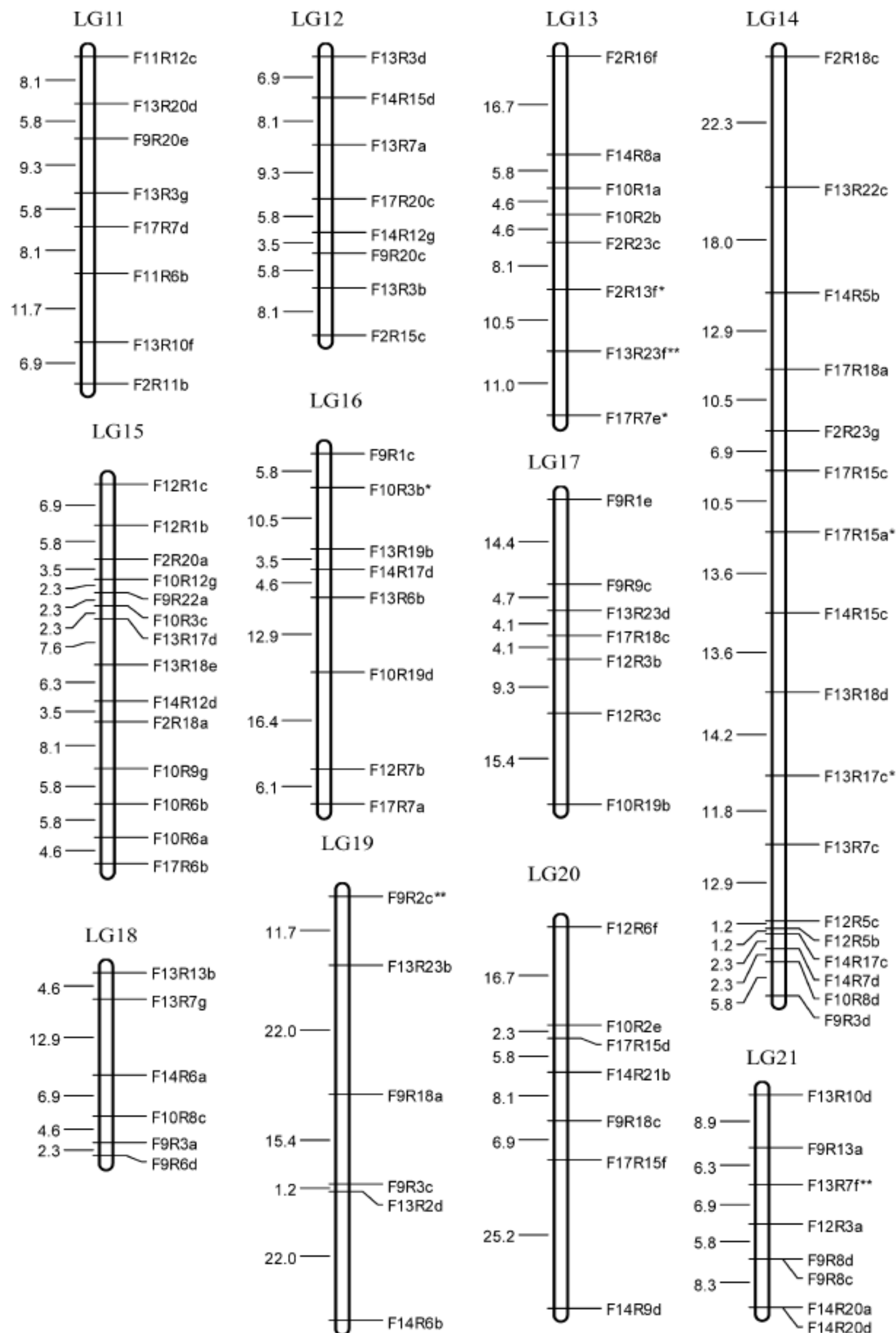


图 2 87 个 F₁ 后代构建的圆瓣姜花的遗传连锁图

每个连锁群的左侧表示遗传距离，单位 cm，右侧是位点名称。偏分离位点用 “*” 表示 (* 0.1 > P > 0.05, ** 0.05 > P > 0.01)

Fig .2 Linkage map of *Hedychium forrestii* developed from 87 hybrids of an F₁ population . Map distances in cm are listed on the left and loci on the right of each linkage group . Markers showing significant levels of segregation distortion are indicated by asterisks (* 0.1 > P > 0.05, ** 0.05 > P > 0.01)

续图 2



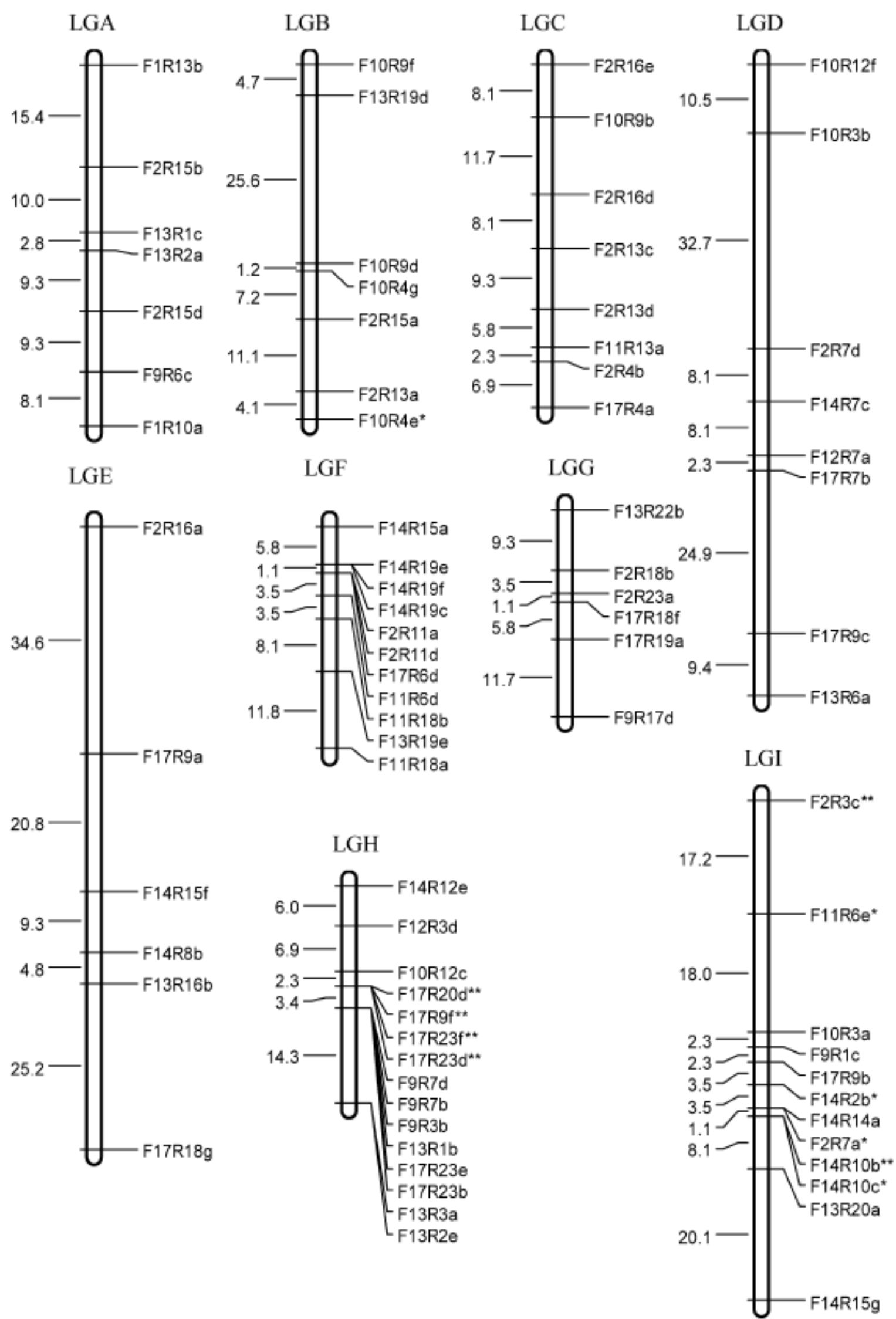
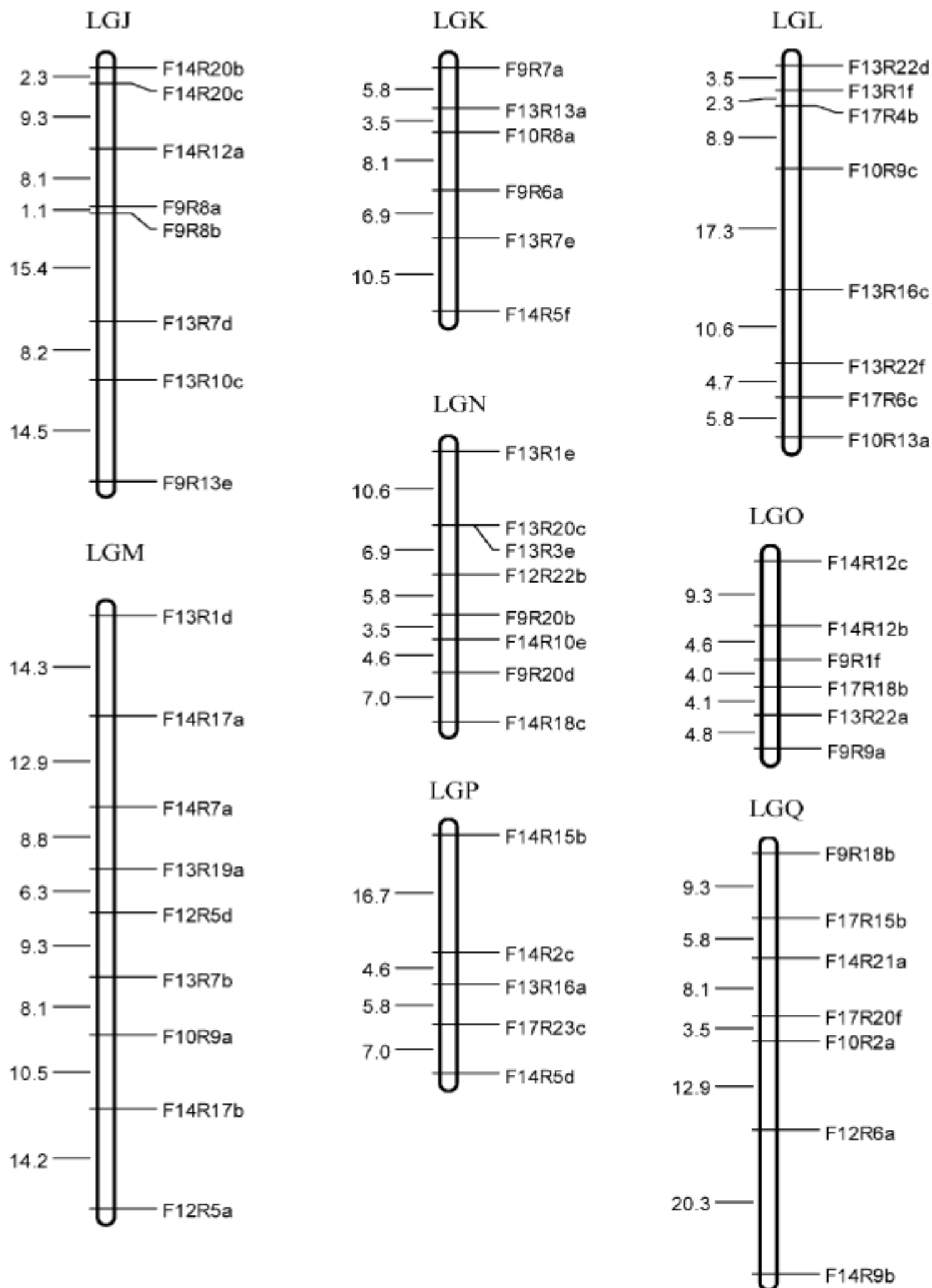


图 3 87 个 F_1 后代构建的白姜花的遗传连锁图

每个连锁群的左侧表示遗传距离，单位 cm，右侧是位点名称。偏分离位点用 “*” 表示 (* $0.1 > P \geq 0.05$, ** $0.05 > P \geq 0.01$)

Fig .3 Linkage map of *Hedychium coronarium* developed from 87 hybrids of an F_1 population .Map distances in cm are listed on the left and loci on the right of each linkage group . Markers showing significant levels of segregation distortion are indicated by asterisks (* $0.1 > P \geq 0.05$, ** $0.05 > P \geq 0.01$)

续图 3



标记的平均间距为 7.7 cm, 10 个标记呈现共分离, 涉及 4 个位点, 6 个零间距。去除这些零间距, 平均间距为 8.0 cm。16 个稍偏离位点进入连锁群, 其中 0.05 水平 12 个, 0.01 水平 4 个, 这些偏分离位点在 LG13 上形成一个聚焦。

3 讨论

3.1 作图群体

本文所用的作图群体是种间杂交的 F_1 群体。母本白姜花, 唇瓣大而美丽, 散发出浓郁的栀子花香气, 苞片覆瓦状排列, 假茎高度中等; 父本

圆瓣姜花，唇瓣较小，有淡香味，苞片卷筒状，假茎高大，生长势旺盛。父母本在形态上差异较大，在本文试验结果上也有所体现——利用 SRAP 标记检测到的 3 1 分离位点仅占 3.1%，这种现象在松树的图谱构建中也有报道（Kubisak 等，1995）。

我们利用 13 个种、品种成功地配制了 20 多个杂交组合，并各自做了自交研究。对结实率的统计发现，杂交组合比其各自自交具有更高的结实率。举例来说，白姜花 × 圆瓣姜花的结实率可达 66%，而各自的自交结实率分别为 13%，8%。

3.2 SRAP 标记选择及其分离

目前基于 PCR 的分子标记对姜花属的分析尚属空白，更不必说姜花属中发布的 SSR 或 EST 等。所以在姜花属的研究中，仅有基于未知序列的标记可用。本文中，我们采用了 SRAP 标记，这种标记在 2001 年被开发，被认为比 RAPD 更具稳定性、比 AFLP 更易操作。SRAP 标记是针对基因编码区开发的，因此该标记反映的信息与表形变异以及表形演化史较其它标记更为一致（Ferriol 等，2003）。也正因为如此，虽然 SRAP 标记可能没有 SSR 在基因组中分布广泛，但基于 SRAP 标记的连锁图谱在进行重要农艺性状的 QTL 定位时也同样有效，甚至更为高效。然而，比起 AFLP 标记，SRAP 单个标记能检测的多态性位点较低，本文中的检测效率平均为 4.5 个每对，在有关 AFLP 的报道中，该值一般能到达 10（Lanteri 等，2006；Hanley 等，2002）。但比较成本及操作程序，用 SRAP 标记仍然是经济的。

在一个 F_1 群体中出现偏分离现象是常见的（Bradshaw 等，1994；Lanuad 等，1995；Krutovskii 等，1998；Arcade 等，2000；Casasoli 等，2001；Han 等，2002；Scalfi 等，2004；Pekkinen 等，2005；Lanteri 等，2006）。本文中，标记的偏离比率为 12.3%，稍低于其他报道中的 14% ~ 18%。关于这种偏分离，其来源可能有两方面，一是基因型统计误差，这是不可避免的；二是生物学因素，后者被认为是更重要的来源。研究发现，当这些偏离位点被忽略时，相当一部分连锁群可能会被排除在外（Cervera 等，2001；Ducleff 等，2004）。因此，本文将偏离水平小于 1% 的位点也用来进行了图谱构建。本文父母本的连锁图中均出现了

偏离位点的聚焦现象，这就印证了这些位点可能与一个影响稳定性的基因相连锁（Lorieux 等，2000；Cervera 等，2001），这种影响稳定性的基因导致了标记的偏分离现象。

3.3 连锁图

本文建立了两张中等密度的连锁图，其中母本的有 18 个连锁群，包含 139 个标记，覆盖了 917.1 cm，标记平均间距为 8.6 cm；父本的连锁图有 23 个连锁群，包含 203 个标记，覆盖了 1386.8 cm，标记平均间距为 8.0 cm，并有一些三联体和二联体出现。从父母本包含的标记数量及覆盖的遗传距离来看，父本可能有更高的杂合性，野生环境比起栽培条件可能更容易诱导基因的变异。在建立的图谱中，有几处出现了标记聚焦的现象。据研究报道，这种聚焦现象也并非罕见，聚焦一般会出现在连锁群偏中部的位点，可能是因为该区域重组率较低的原因（Tanksley 等，1992）。所检测到的 3 1 分离位点仅有 13 个，所以没有建立父母本连锁群的对应关系，下一步我们会选一些多态性更高的标记，如 AFLP 等，来检测更多的拟测交位点，丰富连锁群密度，建立父母本的对应关系。

4 结语

本文是第一次对姜花属遗传连锁图谱构建的尝试，我们对标记之间连锁情况的这些描述是将来检测控制重要农艺性状的基因以及分子标记辅助育种的重要基础。另外，由于姜花属主要依靠无性繁殖，所以所建立的群体是一个永恒的群体，可以用来检测基因与环境间的互作。下一步我们将逐步建立其它杂交群体的遗传连锁图，并引入多态性更高的标记，最终开发出姜花属的 SSR 标记。

〔参 考 文 献〕

- Arcade A, Anselin F, Faivre RP *et al.*, 2000. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 299—307
- Bradshaw HD, Villam, Watson BD *et al.*, 1994. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. . A genetic linkage map of a hybrid poplar composed of RFLP, STS, and RAPD markers [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 273—278

- Casasoli M, Mattioni C, Cherubini M *et al.*, 2001 . A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill .) based on RAPD, ISSR, and isozyme markers [J] . *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 1190—1199
- Cervera MT, Storme V, Ivens B *et al.*, 2001 . Dense genetic linkage maps of three populus species (*Populus deltoids*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers [J] . *Genetics*, 158: 787—809
- Douclet M, Jin Y, Gao F *et al.*, 2004 . A genetic linkage map of grape, utilizing *Vitis rupestris* and *Vitis arizonica* [J] . *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 1178—1187
- Ferriol M, Pico B, Nuez F, 2003 . Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J] . *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 271—282
- Grattapaglia D, Sederoff R, 1994 . Genetic-linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross—mapping strategy and RAPD markers [J] . *Genetics*, 137: 1121—1137
- Gao LX (高丽霞), Hu X (胡秀), Liu N (刘念) *et al.*, 2008 . Cluster analysis of Chinese *Hedychium* based on SRAP markers [J] . *Journal of Systematics and Evolution* (植物分类学报), 46 (6): 899—905
- Han T, van Eck H, de Jeu M *et al.*, 2002 . The construction of a linkage map of *Alstroemeria aurea* by AFLP markers [J] . *Euphytica*, 128: 153—164
- Hanley S, Barker JHA, Van Ooijen JW *et al.*, 2002 . A genetic linkage map of willow (*Salix viminalis*) based on AFLP and microsatellite markers [J] . *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 1087—1096
- Jones ES, Dupal MP, Dumsday JL *et al.*, 2002 . An SSR-based genetic linkage map for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L .) [J] . *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 577—584
- Krutovkii KV, Vollmer SS, Sorensen FC *et al.*, 1998 . RAPD genome maps of Douglas-fir [J] . *The Journal of Heredity*, 89: 197—205
- Kubisiak TL, Nelson CD, Nance WL *et al.*, 1995 . RAPD linkage mapping in a longleaf pine × slash pine F1 family [J] . *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 1119—1127
- Lanaud C, Risterucci AM, Ngoran AKJ *et al.*, 1995 . A genetic linkage map of *Theobroma cacao* [J] . *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 987—993
- Lander ES, Green P, Abrahamson J *et al.*, 1987 . MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary linkage maps of experimental and natural populations [J] . *Genomics*, 1: 174—181
- Lanteri S, Acquadro A, Comino C *et al.*, 2006 . A first linkage map of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L .) based on AFLP, S-SAP, M-AFLP and microsatellite [J] . *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 1532—1542
- Li G, Gao M, Yang B *et al.*, 2003 . Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping [J] . *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 168—180
- Li G, Quiros CF, 2001 . Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J] . *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 455—461
- Lin ZX (林忠旭), Zhang XL (张献龙), Nie YC (聂以春) *et al.*, 2003 . A linkage map of cotton based on SRAP [J] . *Chinese Science Bulletin* (科学通报), 48 (15): 1676—1679
- Lorieux M, Ndjondjop MN, Ghesquiere A, 2000 . A first interspecific *Oryza sativa* × *Oryza glaberrima* microsatellite-based genetic linkage map [J] . *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 593—601
- Pekkinen M, Varoi S, Kuliou KKM *et al.*, 2005 . Linkage map of birch, *Betula pendula* Roth, based on microsatellites and amplified fragment length polymorphism [J] . *Genome*, 48: 619—625
- Porceddu A, Albertini E, Barcaccia G *et al.*, 2002 . Linkage mapping in apomictic and sexual Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L .) genotypes using a two way pseudo testcross strategy based on AFLP and SAMPL markers [J] . *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 273—280
- Scalfi M, Troggio M, Piovani P *et al.*, 2004 . A RAPD, AFLP and SSR linkage map, and QTL analysis in European beech (*Fagus sylvatica* L .) [J] . *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 433—441
- Testolin R, Huang WG, Lain O *et al.*, 2001 . A kiwifruit (*Actinidia* spp .) linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers [J] . *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 30—36
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP *et al.*, 1992 . High density molecular linkage maps for the tomato and potato genomes [J] . *Genetics*, 132: 1141—1160
- Wu DL (吴德邻), 1981 . Zingiberaceae [A] . In: Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志) [M] . Beijing: Science Press, 16 (2): 27